Einfluß von Heparin auf die Änderung der Oberflächenladung von Erytrozythen.

Hans Pfeifer

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523711_0002

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Abteilung für Hämatologie
(Leiter: Prof. Dr. H. Martin)

Einfluß von Heparin auf die Änderung der Oberflächenladung von Erythrozyten.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Hans Pfeifer
aus
Bad Homburg
Frankfurt am Main 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DEKAN : Prof.Dr.med. H.J. Müller

REFERENT : Prof.Dr.med. P.S. Mitrou

KORREFERENT : Prof.Dr.Ing.Dr.chem. Lacko

Tag der mündlichen Prüfung : 30.6.1983

Herrn Prof.Dr. H. Martin danke ich für die Überlassung des Themas, Herrn Dr. Kosta Schopow und Frau Bühler für die stets gewährte Hilfe bei allen technischen und organisatorischen Problemen.

EINFLUSS VON HEPARIN AUF DIE ÄNDERUNG DER OBERFLÄCHENLADUNG VON ERYTHROZYTEN

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I EINLEITUNG

1 Erythrozytenmembran 1

2 Elektrophorese 4

II METHODE

1 Zellaufbereitung

1.1 Zellen 8

1.2 "Waschen" der Zellen 8

1.3 Heparinzusatz , VETREN® 8

1.4 Elektrophorese Apparatur 9

1.5 Pufferlösung nach ZEILLER 11

1.6 PBS - Lösung 12

2 Statistik 13

III ERGEBNISSE 18

IV DISKUSSION 27

V ZUSAMMENFASSUNG 30a

VI ANHANG

1 Mathematische Herleitungen 31

2 Programmablauf 34

VII LITERATUR 48

I EINLEITUNG

1 Erythrozytenmembranen

Zellmembranen der Erythrozyten enthalten circa 50% Proteine, 40% Lipide und 10% Kohlenhydrate, wobei ein großer Teil der Kohlenhydrate an der Außenseite der Membranen von Proteinen getragen werden. Dabei können an der Zellmembran nur neun der über hundert Monosaccharide regelmäßig nachgewiesen werden. Dies sind die Glukose, Galaktose, Mannose, Fucose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin, Arabinose, Xylose und Neuraminsäure.

SINGER und NICOLSON (1) beschreiben in ihrem "Fluid Mosaic Model" diese Membranen als ein zweidimensionales Lösungsmittel aus Lipiden, in das Proteine mehr oder weniger stark eintauchen. Diese Proteine bilden dabei einen integralen Bestandteil der Membranen. Beide, Lipide und integrale Membranproteine, sind in der lateralen Membranebene frei beweglich. Das Zusammenspiel von hydrophoben und hydrophilen Anteilen gilt als Voraussetzung für die thermodynamische Barriere der Membran.
Hydrophile Interaktionen sind für ionisierte und polare Molekülgruppen verantwortlich, während hydrophobe Interaktionen der Abgrenzung gegen Wasser dienen. Die nicht-polaren Aminosäuregruppen der Proteine, zusammen mit den Fettsäureketten der Phospholipide verhindern den Kontakt mit Wasser, wohingegen die ionisierten und polaren Gruppen der Proteine, zusammen mit denen der Lipide und Oligosaccharide den Kontakt mit der wässrigen Lösung herstellen.
Die Proteine der Erythrozytenmembranen können in zwei Gruppen eingeteilt werden : periphere und

integrale Membranproteine (1) .
Integrale Proteine bestimmen die strukturelle Integrität der Membran. Sie machen 70% der Proteine aus und lassen sich nur durch Denaturierung oder agressive Behandlung aus ihrer Umgebung herauslösen. Sie sind von einheitlicher Struktur (2) .
Periphere Proteine sind dagegen für Interaktionen mit anderen Stoffen (Lösungsmittel, Eiweiße usw.) verantwortlich. Sie zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, den Ionisationszustand und das Dissoziierungsvermögen zu verändern.

Die beiden unterschiedlichen Proteingruppen sind für verschiedene Membranfunktionen zuständig : beispielsweise Stabilität (Sphärozytose), Rezeptorfunktion (Blutgruppe), Transport durch die Membran. Dabei gibt die Oberflächenladung einen direkten Hinweis auf die Funktion. Ändert sich die Oberflächenladung, so ändern sich auch die Eigenschaften der gesamten Zelle (3). Aufhebung der Kontaktinhibition (3) und Altersbestimmung (4) sind dafür ein Beweis.
So sind die Makrophagen der Milz in der Lage, aus der Oberflächenladung das Alter des Erythrozyten zu bestimmen und deshalb eine Selektion bei der Milzpassage durchzuführen (3,4) . Ältere Zellen haben eine weniger negative Ladung als jüngere Zellen. Dieses drückt sich in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit am deutlichsten aus. Trotz der Oberflächenladungsänderung bleiben andere biophysikalische Parameter, wie osmotische oder mechanische Verletzlichkeit, erhalten (5) .

Bei allen bisherigen Versuchen die Oberflächen-

ladung der Erythrozyten zu verändern, stand die Neuraminidase im Vordergrund. Sie entfernt negative Ladungsträger : die N-Acetylneuraminsäure (5 , 6) .

Heparin, eine körpereigene Substanz, ist ebenfalls in der Lage, durch Bindung an die Zelloberfläche, Ladungsveränderungen an bestimmten Oberflächenstrukturen, den Aminosäuren der Mucopolysaccharide, vorzunehmen (7) .

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, daß sich die Häufigkeitsverteilung von Erythrozyten Gesunder nach der elektrophoretischen Trennung wie eine Normalverteilung verhält.
Weiterhin soll untersucht werden, in welcher Weise Heparin die elektrophoretische Mobilität von Erythrozyten beeinflußt und ob durch Heparin die Häufigkeitsverteilung der Erythrozyten verändert wird.

Die Festigkeit der Heparinbindung an der Erythrozytenoberfläche soll analysiert werden.

2 Elektrophorese

Zur Trennung von Zellen mit unterschiedlicher Oberflächenladung benutzt man die Elektrophorese.

Wie bereits dargestellt, sind es die polaren Gruppen der Proteine, bzw. der Glukoproteine, die den Kontakt mit Wasser herstellen. Es kommt zu Ionenbindungen zwischen Wassermolekülen einerseits und Amino- und Carboxylgruppen der Glukoproteine andererseits. Die Zellmembran ist also hydratisierbar. Die Affinität der Wassermoleküle an positive Ionen ist größer, als an negative (8) . Es entstehen so bestimmte Verteilungsmuster der Wassermoleküle auf der Membranoberfläche als "Negativ" der Oberflächenladungsverteilung. Da Wassermoleküle einen Dipol darstellen, bilden sich durch Zusammenlagerung größere Aggregate (9) . Diese erzeugen eine feste Hydrathülle mit ausgerichteten Dipolen, die erst weiter entfernt, das heißt nach mehreren Molekülschichten, in die normale Wasserstruktur übergehen.

Die Gesamtheit der Oberflächenladungen einer Zelle bildet, wenn man nur weit genug von ihr entfernt ist (Zellradius $\ll$ Abstand), das Fernfeld im elektrischen Sinn. Dieses Fernfeld tritt mit einem äußeren elektrischen Feld in Wechselwirkung, sodaß sich die Zellen, den Kraftlinien folgend, bewegen.
Betrachtet man alle Zellen in dem elektrischen Feld, so ist deren Bewegung das Ergebnis linearer Überlagerungen : elektrostatisches äußeres Feld - Zelloberflächennettoladung.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen (Weg pro Zeiteinheit) ist daher abhängig von der Nettoladung der Zelloberflächen, wenn die äußeren Bedingungen gleich bleiben. Überwiegt die negative Ladung, so wandern die Zellen zur positiven Elektrode und umgekehrt.
Bleiben die äußeren Bedingungen gleich, so ist die Wanderungsgeschwindigkeit bzw. deren Änderung ein Maß für die Hydratisierung der Zelloberfläche :

$$F = Q\ U/d \qquad (1)$$

mit F der Kraft auf die Nettoladung Q , U der Elektrodenspannung und d deren Abstand.

Die Verteilung der Nettoladungsdichte auf den einzelnen Zelloberflächen kann man aus der Bedingung für die Gleichheit von elektrischer und thermischer Energie ableiten.
Es gilt nach DEBYE und HÜCKEL die folgende Näherung für das elektrische Potential einer kreisförmigen Oberfläche in Abhängigkeit vom Abstand zu ihr :

$$\psi = \zeta e^{-\kappa \cdot x} \qquad (2)$$

mit κ = konst., ζ dem Potential zwischen Oberfläche der Zellen und Flüssigkeit und x dem Abstand zur Oberfläche.

Aus dieser Gleichung lassen sich Beziehungen herleiten, bei denen ganz bestimmte Randbedingungen, wie sie hier zutreffen, erfüllt sind.

Die Betrachtung der Ladungsverteilung, die auf einer mit oben beschriebener Membran ausgestatteten Zelle herscht, führt unter Berücksichtigung der Gesetze visköser Flüssigkeiten zur HELMHOLZ-SMOLUCHOWSKI Gleichung :

$$U = \frac{\zeta D}{4\pi\eta} \qquad (3)$$

mit U der Mobilität, ζ der Potentialdifferenz zwischen Oberfläche der Zelle und umgebender Flüssigkeit, D der dielektrischen Konstante der Suspension und η der Viskosität der Suspension.

Dabei werden folgende Annahmen gemacht:

a) der Krümmungsradius der Zelle ist groß ($\kappa \cdot x > 100$)
b) die Zelloberfläche ist nicht leitfähig
c) elektrische Eigenschaften haben gleiche Größenordnung (D,η)
d) es gibt keinen Geschwindigkeitsgradienten zwischen Zelle und Suspension
e) äußeres Feld und Fernfeld der Zelle können linear überlagert werden.

Weiterhin hat sich gezeigt, daß die Mobilität dieser Zellen unabhängig von ihrer Größe und Dichte ist.
Für die Ladungsdichte dieser sphärischen Zellen bei kleinem ζ - Potential ergibt sich :

$$\sigma = \frac{D \zeta \kappa}{4 \pi} \qquad (4) \ .$$

Aus Gleichung (3) läßt sich das ζ - Potential berechnen, da es sich bei den übrigen Größen um Konstanten der Suspension bzw. um meßbare Größen, die elektrophoretische Mobilität, handelt.
Mit Hilfe des ζ - Potentials kann dann auf die Ladungsdichte der Zelloberfläche geschlossen werden, vor allem kann deren Änderung bestimmt werden.

II METHODE

1 Zellaufbereitung

1.1 Zellen

Die zu untersuchenden Zellen werden als Nativblut (40µl) dem Ohrläppchen entnommen und mit 5 ml PBS suspendiert. Anschließend wird diese Suspension für 10 Minuten bei $4^{\circ}C$ und 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen ($3\text{-}4 \cdot 10^{7}$) in 1 ml Kammerpuffer resuspendiert (Zusammensetzung des Kammerpuffers und PBS siehe unter II , 1.5 und II , 1.6).

1.2 "Waschen" der Zellen

Nativblut wird mit 2,5 ml PBS suspendiert und bei $4^{\circ}C$ und 1000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. 80 µl der sedimentierten Zellen werden mit Kammerpuffer versetzt und resuspendiert. Dieser Schritt wird je nach Anzahl der Waschvorgänge wiederholt.

1.3 Heparinzusatz , VETREN®

Der Heparinzusatz erfolgt nach der Resuspendierung in Kammerpuffer mit :
0,1 IE - 0,5 IE - 1 IE - 2,5 IE - 5 IE - 10 IE - 50 IE - 100 IE - 200 IE Vetren®.
Das Gemisch aus Zellsuspension und Heparin wird nun der Trennvorrichtung zugeführt.

1.4 Elektrophorese Apparatur

Die elektrophoretische Trennung erfolgt auf der in Abb. 1 gezeigten Elektrophoreseapparatur VAP 5 der Firma Bender & Hobein, München. Wichtig bei der Methodik der Trennung ist, daß keine Viskositätskräfte in der Trennkammer auftreten, damit sich die Zellen ungehindert bewegen können. Dieses läßt sich mit einer trägerfreien Elektrophorese realisieren.
Das Puffer-Zell-Gemisch wird einem Pufferstrom in der Trennkammer kontinuierlich zugeführt. (Abb. 1) Der Pufferstrom hat konstante Geschwindigkeit. Am Ende der senkrecht angeordneten Kammer sorgt eine über die gesamte Kammerbreite wirksame Rollenpumpe für einen konstanten Fluß des Puffer-Zell-Gemischs. Darunter angeordnete Behälter fangen die Zellsuspension auf. Deren Inhalt kann anschließend analysiert werden, d.h. die Zellzahl pro Behälter wird bestimmt.
An den Seitenwänden der Trennkammer sind Elektroden angebracht, die zur Erzeugung des benötigten elektrischen Feldes dienen. Diese verleiht den Zellen einen Geschwindigkeitsanteil in Feldrichtung :

$$v = \frac{U \cdot Q}{d \cdot m \cdot t} \qquad (5)$$

U = Elektrodenspannung
d = deren Abstand
Q = Oberflächennettoladung
m = Masse der Zelle
t = Einwirkungszeit

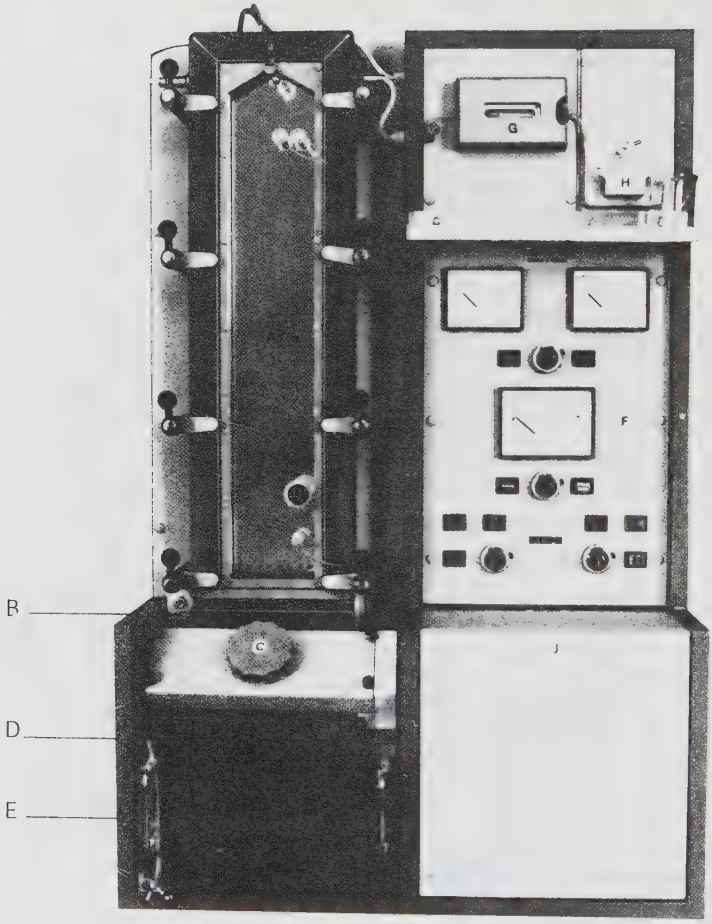


Abb. 1

Elphor VaP5-Gerät (Tischmodell)

A Trennkammer
B Absaugleiste
C Saugpumpe
D Fraktionssammler-Deckel
E Fraktionssammler-Gehäuse
F Elektronik-Einheit
G Zellsuspender
H Dosierpumpe
J Manometerfach

Abb. 1

Beide Bewegungen überlagern sich linear.
Dabei ist die horizontale Ablenkung nur noch eine Funktion des elektrischen Feldes, weil alle anderen Parameter während der Trennung konstant gehalten werden.
Die Elektrodenspannung U ist über den Puffer-Zell-Widerstand (1/Leitfähigkeit) fest mit dem Kammerstrom verknüpft. Inhomogenitäten des elektrischen Feldes treten in der Nähe der Elektroden auf (10),
$\text{grad}_{\text{vert.}} \vec{E} \neq 0$.
Dieser Bereich ist bei der Trennung zu meiden.

1.5 Pufferlösung nach ZEILLER

Die verwendete Pufferlösung hat folgende Zusammensetzung :

20g	D (+)-Glucose (Monohydrat) $C_6H_{12}O_6 \ H_2O$ Fa. Merck Art.8342
90g	Glycocoll H_2NCH_2COOH Fa. Merck Art.4201
35g	Saccharose reinst $C_{12}H_{22}O_{11}$ Fa. Merck Art.7653
10ml	Triethanolamin $C_6H_{15}NO_3$ Fa. Merck Art.8379
ad 5000ml	aqua dest.

Der pH-Wert wird auf Werte zwischen 7,2-7,3 mit etwa 2-3 ml Essigsäure (CH_3COOH , Fa.Merck Art. 63) eingestellt.

Die Leitfähigkeit soll 800 - 900 µS betragen. Sie kann mit Kaliumacetat (CH_3COOK , Fa. Merck Art. 4820) beeinflußt werden. Die Osmolarität der Pufferlösung beträgt 280 - 300 milliosmol.

1.6 PBS - Lösung

Die verwendete Lösung hat folgende Zusammensetzung :

160 ml 1/15 M di-Natriumhydrogenphosphat
Fa. Merck Art. 6587

40 ml 1/15 M Kaliumhydrogenphosphat
Fa. Merck Art. 4875

1800 ml NaCl 0,9% .

Der pH-Wert wird auf Werte zwischen 7,2-7,3 mit etwa 2-3 ml Essigsäure (CH_3COOH , Fa. Merck Art. 63) eingestellt. Die Osmolarität beträgt etwa 280-300 milliosmol.

2 Statistik

In die oben beschriebene Versuchsanordnung werden zusammen mit dem Puffer circa $3\text{-}4 \cdot 10^7$ Zellen kontinuierlich aufgetragen. Besitzen alle diese Zellen gleiche Oberflächenladungsdichte, so muß sich nach statistischen Grundsätzen die Wahrscheinlichkeitsdichte am Ende der Kammer wie eine Normalverteilung verhalten.
In unserem Fall führt die Messung zu einer diskreten Häufigkeitsverteilung. Verbindet man deren Klassenmitten, so ergibt sich eine Normalverteilung bei genügend kleiner Klassenbreite. Diese läßt sich auf Grund der hohen Zahl der Versuchsteilnehmer (Zellen) erzielen und wir erhalten somit eine in hohem Maße stetig verteilte Zufallsvariable. (Abb. 2)

Eine sinnvolle mathematische Formulierung der Häufigkeitsverteilung ist die Wahrscheinlichkeitsdichte der Normalverteilung :

$$y = f\left(e^{x^2} \right) = a\, e^{bx-cx^2} \qquad (6)$$

mit a, b, c gleich konst.,
x dem Klassenwert (Abszisse),
y Anzahl der Zellen an der Stelle x (Ordinate).

Die rechnerische Ermittlung der Standartabweichung und des Mittelwertes ist dem Anhang zu entnehmen.

Um die Funktion der Wahrscheinlichkeitsdichte zu

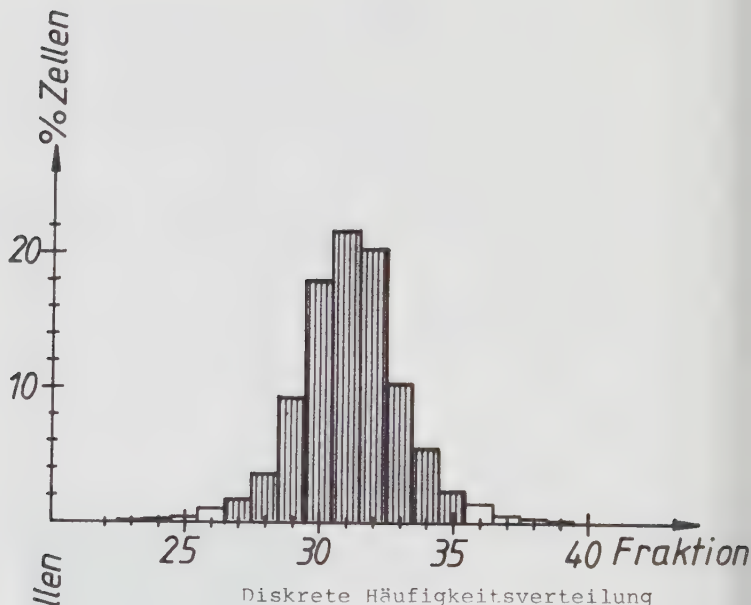
bestimmen (Gleichung 6) , müssen deren Konstanten ermittelt werden. Dabei bedient man sich am sinnvollsten der " Methode der kleinsten Quadrate " (siehe Anhang) . Es lassen sich auf diese Weise recht einfach der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung s berechnen. Zusätzlich kann eine Korrelationsanalyse angeschlossen werden, welche Zusammenhänge zwischen gleichwertigen Zufallsvariablen an Hand einer Stichprobe aufzeigt. Die Güte dieser Anpassung wird mit dem χ^2 - Test nachgeprüft.

Die gesamte rechnerische Durchführung wird von einem programmierbaren Tischrechner der Firma HEWLETT PACKARD , HP 97 , übernommen. Die Programmausführungen sind dem Anhang zu entnehmen.

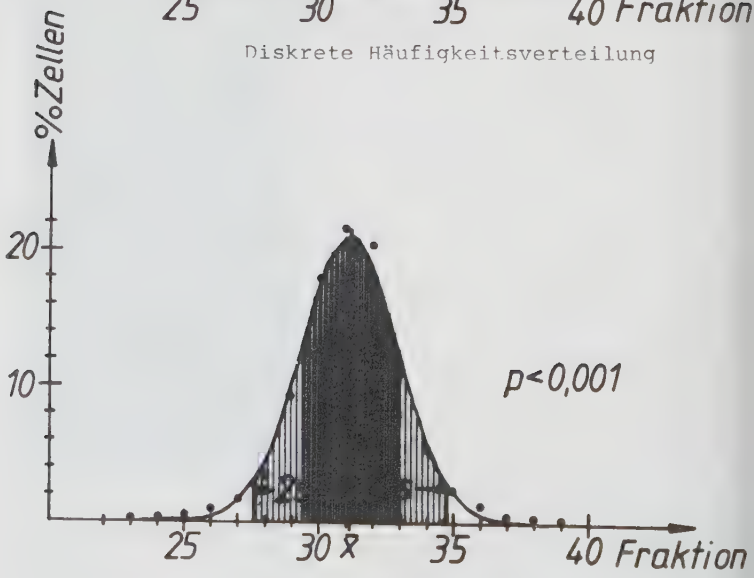
Tabelle 1 Diskrete Häufigkeitsverteilung

Beispiel: Erythrozyten-Verteilung (Abb. 2)

Fraktion	% Zellen
22	0,1
23	0,2
24	0,3
25	0,4
26	0,9
27	1,7
28	3,7
29	9,3
30	18
31	21,7
32	20,4
33	11,3
34	5,5
35	2,5
36	1,4
37	0,6
38	0,4
39	0,3



Diskrete Häufigkeitsverteilung



Stetige Häufigkeitsverteilung

Abb. 2 Erythrozyten-Verteilung

Tabelle 2 Mathematische Anpassung an die diskrete Häufigkeitsverteilung

Fraktion 27-35

$$y = a\, e^{bx - cx^2}$$

mit: $\ln a = -144,6$ $\quad [a = e^{\ln a}]$

$b = 9,474$

$c = 0,152$

$r_9 = 0,991 \quad (p < 0,001)$

$\chi^2_9 = 1,42 \quad (p < 0,005)$

$F = 95,2\ FE$

$\bar{x} = 31,16$

$s = \pm 1,81$

III ERGEBNISSE

Es wurden zunächst Erythrozytenverteilungen von 98 klinisch gesunden Probanden analysiert. Dabei wurden einmal die Stützpunkte für die mathematische Berechnung innerhalb der einfachen Standartabweichung vom Mittelwert gewählt, zum anderen innerhalb der doppelten Standardabweichung vom Mittelwert. Vergleicht man beide Anpassungsfunktionen, so stellt man fest, daß die Anpassungsgenauigkeiten jeweils besser als 95% sind, also $p < 0{,}05$. Die durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten liegen in beiden Fällen höher als $0{,}99$, $p < 0{,}001$.
Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß in die Bewertung der Anpassungsgenauigkeit und des Korrelationskoeffizienten nur die Stützpunkte eingehen, die zur Approximation verwandt werden. Dehnt man die Berechnung der Anpassungsfunktion und des Korrelationskoeffizienten bei Verwendung der Stützpunkte innerhalb der einfachen Standardabweichung auf die der doppelten Standardabweichung aus, so sinkt der Korrelationskoeffizient auf $r = 0{,}35$ (durchschnittlich) und die Anpassungsgenauigkeit auf Werte unter 50% . Eine signifikante Korrelation zwischen vorgegebenen Werten und mathematischer Anpassung liegt nicht mehr vor.

Bei allen weiteren Untersuchungen werden deshalb Stützpunkte verwandt, welche $\pm$ 2s oder

mehr an Fläche einschließen. Die Grenzen der Standardabweichung sollen, damit die Sicherheit der Anpassung mindestens 95% beträgt, zwischen s=1 und s=2 betragen (siehe Abb. 2a) .

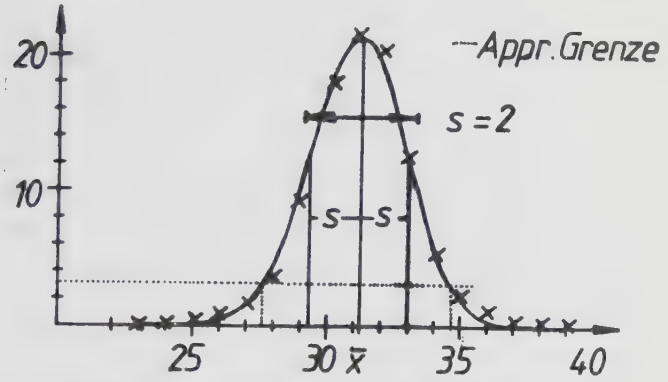


Abb. 2a Grenzen der Standardabweichung

Zur experimentellen Bestätigung wurden 28 Gipfelfraktionen und diejenigen, die jeweils s - weit vom Mittelwert entfernt lagen, erneut elektrophoretisch getrennt. Es ergaben sich stets Normalverteilungen, deren Standardabweichungen sich im festgelegten Bereich befanden.

Bei den weiteren Untersuchungen wurden, wie bereits in Abschnitt II beschrieben, die Oberflächenladungsdichten der Erythrozyten mit Heparin verändert.
Der Mittelwert ohne Heparinzusatz wird als Leer- bzw. Nullwert angesehen. Die von diesem

Wert abweichenden Mittelwerte werden als Δ - Fraktion aufgetragen.
Bei niedrigem Heparin-Zusatz (0,1-0,5 IE) bleibt die Erythrozytenverteilung gleich derjenigen ohne Heparin-Zusatz. Der t-Test ergibt eine Irrtumswahrscheinlichkeit gegenüber dem Nullwert von größer als 50% .
Nimmt die Heparin-Dosis in der Zellösung zu (1-50 IE) , so findet eine Gipfelverschiebung in Richtung auf die positive Elektrode statt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit sinkt beim Vergleich mit dem Nullwert (t-Test) unter 5% , bei 10 IE und mehr Heparin sogar unter 0,1% .
Bei Heparin-Zusätzen über 50 IE ändert sich die Gipfelverschiebung nur unwesentlich, es tritt ein Sättigungsverhalten auf. Die Trennschärfe zwischen den Mittelwerten beim Zusatz von 200 IE - 100 IE - 50 IE Heparin liegt im t-Test über 50% , d.h. es ist keine Unterscheidung mehr möglich (Tabelle 3) .
Die Dosis-Wirkungs-Kurven der fünf untersuchten Probanden gibt Abb. 3 wieder.
Auf der Abszisse wurde dabei in logarithmischem Maßstab die zunehmende Heparin-Konzentration aufgetragen, auf der Ordinate die jeweilige Differenz zum Nullwert : Δ -Fraktion.
Die Standardabweichung an den jeweiligen Titrationspunkten aller Probanden war nie größer als 2,0 Fraktionen. Der Mittelwert der Gipfelwanderung beim Zusatz zwischen 1 und 50 IE Heparin betrug 5,6 $\pm$ 1,5 Fraktionen.

Um die Stabilität der Heparin-Bindung an die

Zelloberfläche zu verifizieren, wurden an 8 gesunden Probanden weitere Versuchsreihen durchgeführt : das an der Zelloberfläche haftende Heparin sollte "abgewaschen" werden.
Zunächst wurde eine Zellsuspension, wie in II , 1.1 beschrieben, hergestellt und elektrophoretisch getrennt. Der berechnete Mittelwert der Erythrozytenverteilung stellt den Ausgangs- oder Leerwert dar.
Es folgt das "Waschen" der Zellen (II , 1.2). Nach jedem "Waschvorgang" wird die Zellsuspension erneut getrennt.
In Tabelle 4 sind die Differenzen der Mittelwerte zwischen Ausgangswert und nach dem ersten, zweiten und dritten "Waschvorgang" als Δ -Fraktion aufgeführt. Mit der Hilfe des t-Tests kann zwischen Nullwert und Mittelwert nach ein-oder mehrmaligem "Waschen" kein Unterschied festgestellt werden, d.h. die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt höher als 50% .
Bei gleichem Testablauf, wie oben beschrieben, werden den ursprünglichen Zellsuspensionen, außer der Ausgangssuspension, 50 IE Heparin zugefügt.
Tabelle 5 zeigt die Differenz der berechneten Mittelwerte im Vergleich zu den Ausgangswerten ohne Heparin : Δ -Fraktion.
Es zeigt sich wieder, daß sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Erythrozyten ändert: der t-Test ermittelt Unterschiede zwischen Ausgangswert und Erythrozytensuspension mit Heparin-Zusatz. Die Signifikanz beträgt mindestens 1% .

Durch "Waschen" der Erythrozyten eine Veränderung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit nachzuweisen, gelingt nicht. Im t-Test ist die Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen Suspension + Heparin vor dem "Waschen" zu Suspension + Heparin nach ein- oder mehrmaligem "Waschen" größer als 50 % , d.h. verschiedene Zellsuspensionen sind bezüglich ihrer Mittelwerte nicht mehr unterscheidbar.

Heparin-Zusatz [IE Vetren R]	Δ-Fraktion Probanden					
	D.F.	A.P.	T.B.	F.W.	K.S.
0	0,9	2,2	-	0,7	-1,1
0,1	0,8	3,5	2,8	0,3	-0,7
0,5	0,2	3,4	0,8	-0,3	0,6
1	-	4,1	-	-1,1	-
2,5	0,1	6,1	4	3,4	-0,5
5	2,5	9,3	4,3	3,2	1,3
10	8,1	9,6	4,9	3,7	4,2
20	9,1	10,2	6,5	3,6	4,6
50	9,8	-	6,5	-	4,8
100					
200					

Tabelle 3 Differenzen zwischen Nullwerten und Fraktionen bei versch. Heparinzusätzen

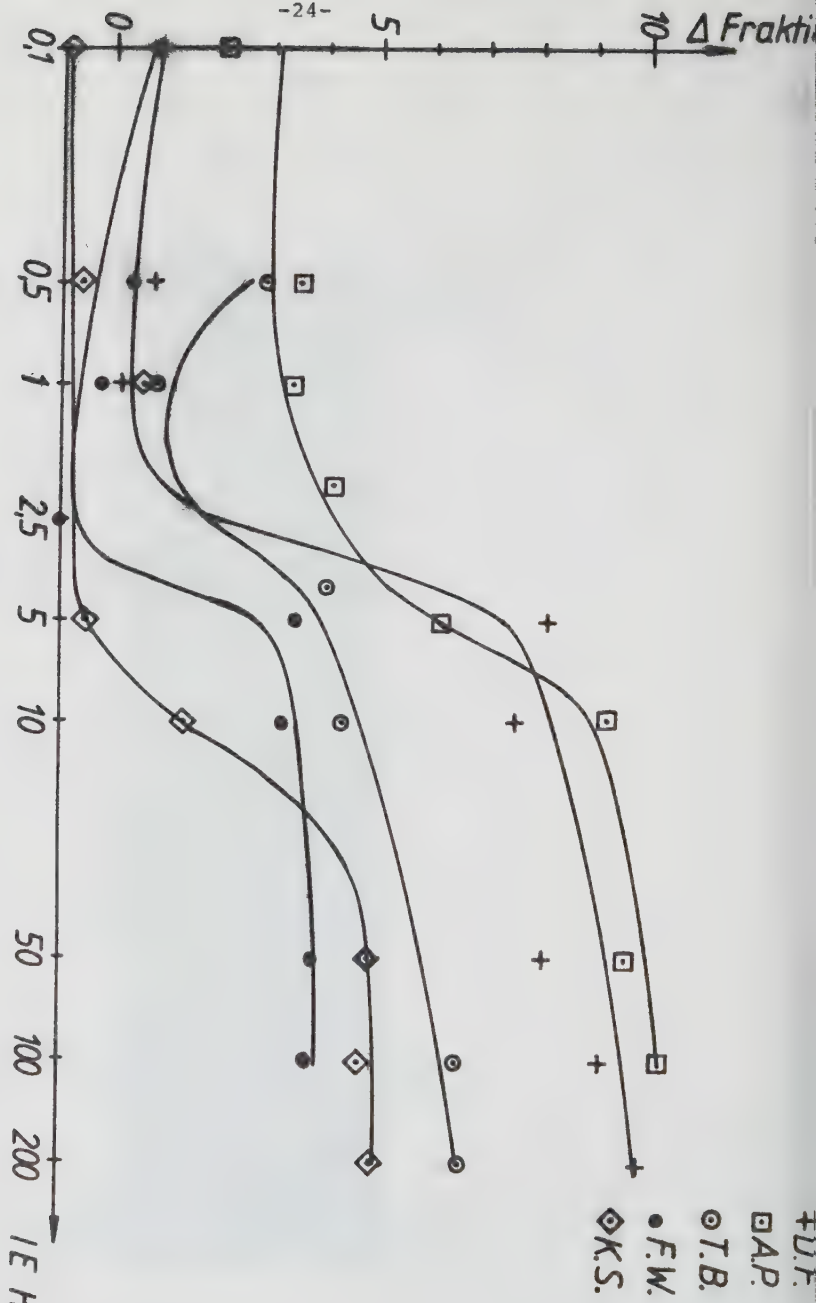


Abb. 3 Differenzen zwischen Nullwerten und Fraktionen bei versch. Heparinzusätzen : graph. Darstellung

Probanden	Δ - Fraktion (ohne Heparin, Vetren®)		
	1x "waschen"	2x "waschen"	3x "waschen"
H.V.	0,4	0,2	- 0,3
E.G.	0,4	0,3	0,3
H.P.	0,4	0,3	- 0,2
N.N.	0,2	0,0	0,5

Tabelle 4 Differenzen der Mittelwerte zwischen Ausgangswert und nach x-maligem "waschen"

Probanden	Δ - Fraktion			
	50 IE Vetren^{R}	50 IE Vetren^{R} +1x "waschen"	50 IE Vetren^{R} +2x "waschen"	50 IE Vetren^{R} +3x "waschen"
M.M.	3,0	2,9	3,1	3,3
K.P.	3,4	3,6	3,9	3,8
H.V.	2,7	2,7	2,4	2,4
N.N.	2,6	2,7	2,7	3,1

Tabelle 5 Differenzen der berechneten Mittelwerte im Vergleich zu den Ausgangswerten ohne Heparin

IV DISKUSSION

Erfahrungsgemäß haben Häufigkeitsverteilungen aus naturwissenschaftlichen Daten selten große Ähnlichkeit mit einer Normalverteilung. Das liegt in der Regel an einem zu kleinen Stichprobenumfang.

Bei den empirischen Verteilungen, die hier an Normalpersonen gemessen wurden, ist die Stichprobe jedoch von ungeheurer Größe : $3\text{-}4 \cdot 10^7$ Zellen. Diese große Zahl an Zellen werden zu 8 - 12 Klassen der Einheitsbreite " 1 " zusammengefaßt : Histogramm (Abb. 2) .
Vergleicht man diese empirische Verteilung mit einer hypothetischen Grundgesamtheit (Anpassungsfunktion) , mit Hilfe einer geeigneten Prüfgröße (χ^2- Test) , so läßt sich bei vorhandener Signifikanz der Prüfung schließen, daß beim Zustandekommen der empirischen Verteilung die gleichen Ursachen wirksam waren, die der theoretischen Verteilung zugrunde liegen.
Hier ergaben sich Prüfgrößen, deren Signifikanzen höher als 95% sind : $p < 0{,}05$.

Die in der trägerfreien Elektrophoreseapparatur (Abb. 1) ermittelten Verteilungen sind also, konstante Bedingungen vorausgesetzt, Normalverteilungen mit der Schiefe Null.

Das gleiche Ergebnis findet man, wenn, wie in Kapitel III erläutert, Einzelfraktionen nochmals elektrophoretisch getrennt werden.
Diese Resultate bedeuten, daß jede Fraktion (Zellgehalt etwa $1 \cdot 10^6$ bis $8 \cdot 10^6$) aus einem einheitlichen Kollektiv von Zellen mit einer bestimmten Oberflächenladung besteht.
Eine gute Reproduzierbarkeit wird dadurch untermauert, daß die ermittelten Standardabweichungen der Einzeltrennungen auch normalverteilt sind (11).

In Kapitel III wird die Forderung erhoben, daß $1 \leq s \leq 2$ sein soll, damit eine Anpassungsgenauigkeit von mehr als 95% erzielt wird. Diese Bedingung wird in allen durchgefürten Trennungen eingehalten.
Umgekehrt ist eine Standardabweichung $s > 2$ ein Zeichen dafür, daß sich unter der ermittelten Verteilungskurve zwei oder mehrere unterschiedliche Ladungsträgerkollektive verbergen.
Diese können mit Hilfe des von uns entwickelten Subtraktionsverfahrens voneinander separiert werden. Deren Standardabweichungen liegen dann wieder im " Normbereich " .

Zur Veränderung der Oberflächenladungsdichte ist Heparin sehr gut geeignet, weil es sich durch seine Sulfatreste als sehr stark negativ ionisiertes Mucopolysaccharid an Oligosaccharide der Zellmembranen bindet. Die Säurereste dieser langkettigen Moleküle reagieren vorzugsweise mit Aminogruppen,sodaß in diesem Fall eine nicht kovalente Bindung zur Neutralisation der positiven Aminogruppen führt (7 , 12) . Eine Hydratisierung ist an diesen Stellen nicht mehr möglich. Die Folge ist eine Änderung der elektrophoretischen Mobilität

im elektrischen Feld in Abhängigkeit von der Menge des zugesetzten Heparins (13 , 14) . Die Summe der Oberflächennettoladung nimmt ab, das Fernfeld der Zelle wird negativer und die Kräfte in Richtung der positiven Elektrode nehmen zu.
In Versuchsreihen an Probanden (5)(Tabelle 3 , Abb. 3) ist das eindrucksvoll demonstriert. Geringer Heparinzusatz reicht offenbar noch nicht aus, eine deutliche Oberflächenladungsänderung zu verursachen. Erst eine bestimmte Konzentration löst eine Mobilitätsänderung aus. Diese beginnt bei ungefähr 1 IE Heparin pro Zellsuspension, d.h. circa 8 μg Heparin. Sind alle neutralisierbaren Aminogruppen besetzt (15) , ruft weiterer Zusatz von Heparin keine Mobilitätsänderung mehr hervor (Kapitel III).
Es fällt jedoch auf, daß erhebliche individuelle Unterschiede der Reagibilität auf Heparin existieren. Dieses ist auf die durch exogene Faktoren beeinflußbare Oberflächenladung zurückzuführen (4 , 16) . Die Erythrozyten besitzen sozusagen verschiedene Ausgangsniveaus ihrer Oberflächenladungsdichte und sind dadurch unterschiedlich empfindlich für Heparin.
Dieses drückt sich in der nicht gleichförmigen Änderung der elektrophoretischen Mobilität aus.

Wie bereits beschrieben (Kapitel III) , liegt die Standardabweichung bei $s < 2$ an allen Titrationspunkten. Daraus folgt unmittelbar, daß alle Zelloberflächen Heparin in gleicher Menge binden. Selbst die individuellen Unterschiede der Sensitivität bleiben unbeeinflußt. Es kommt zu einer gleichförmigen Mobilitätsänderung.

Heparin hat eine besonders feste Bindung (nicht-kovalent) an die Aminogruppen der Mucopolysaccharide. Aus den durchgeführten Untersuchungsreihen geht hervor, daß es selbst mit niedermolaren Lösungen, wie PBS, nicht gelingt, die Bindung an die Zelloberfläche zu beenden (Tabelle 5)(13). In der Kontrollgruppe (Tabelle 4) zeigt sich keine Veränderung der Oberflächenladung, PBS beeinflußt die elektrophoretische Mobilität in keiner Weise.
Heparin beeinflußt die Nettooberflächenladung nachhaltig, die Bindung an die Zelloberfläche kann nur durch massiven Eingriff, wie zum Beispiel mit Polylysin (Heparin Antagonist), aufgehoben werden (13 , 16) .

ZUSAMMENFASSUNG

Erythrozytenmembranen enthalten circa 50% Proteine, 40% Lipide und 10% Kohlenhydrate. Den Kontakt mit einer wässrigen Umgebung stellen dabei die Mucopolysaccharide der Proteine her. Diese positiven Ladungsträger lassen sich durch ein stark negativ geladenes Mucopolysaccharid, Heparin, neutralisieren.

Im elektrischen Feld einer trägerfreien Elektrophorese ändert sich die Wanderungsgeschwindigkeit von Erythrozyten nach Heparinzusatz signifikant gegenüber der ohne Heparinzusatz. Die Heparinbindung an die Erythrozytenoberfläche ist sehr fest.

Den ermittelten Histogrammen aus der trägerfreien Elektrophorese wird die Funktion $y = a \cdot e^{bx-cx^2}$ mit einer Sicherheit von 95% ($p < 0{,}05$) angepaßt. Die errechnete Standardabweichung übersteigt bei konstanten Randbedingungen einen festgelegten Wert ($s = 2$) nicht.

V ANHANG

1 Mathematische Herleitung der für die Approximationsfunktion benötigten Parameter a , b , c .

2 Programmablauf
Computerprogramme

Berechnung der Parameter einer Gauss'schen Verteilungsfunktion

$$y = f(e^{x^2}) = a \cdot e^{bx - cx^2}$$

$$y' = a \cdot e^{bx - cx^2}(b - 2cx) \stackrel{!}{=} 0$$

$$\rightarrow \quad \bar{x} = \frac{b}{2c}$$

$$y_{(x=\bar{x})} = a \cdot e^{\frac{b^2}{4c}} = y_{max.}$$

$$y'' = a \cdot e^{bx - cx^2}(b^2 - 4bcx + 4c^2x^2 - 2c) \stackrel{!}{=} 0$$

$$\rightarrow \quad s = \pm \frac{1}{\sqrt{2c}} + \bar{x}$$

$$y_{(x=\bar{x}\pm 2s)} = a \cdot e^{\frac{b^2}{4c}} \cdot e^{-2} \approx y_{max} \cdot \frac{1}{7}$$

Linearisierung:

$$\ln y = \ln a + bx - cx^2$$

$$\rightarrow \quad \ln y = c \cdot (x - \bar{x})^2 + \ln a + \bar{x}^2 \cdot c$$

$$\hat{Y} = c \cdot \hat{X} + \ln a + \bar{x}^2 \cdot c$$

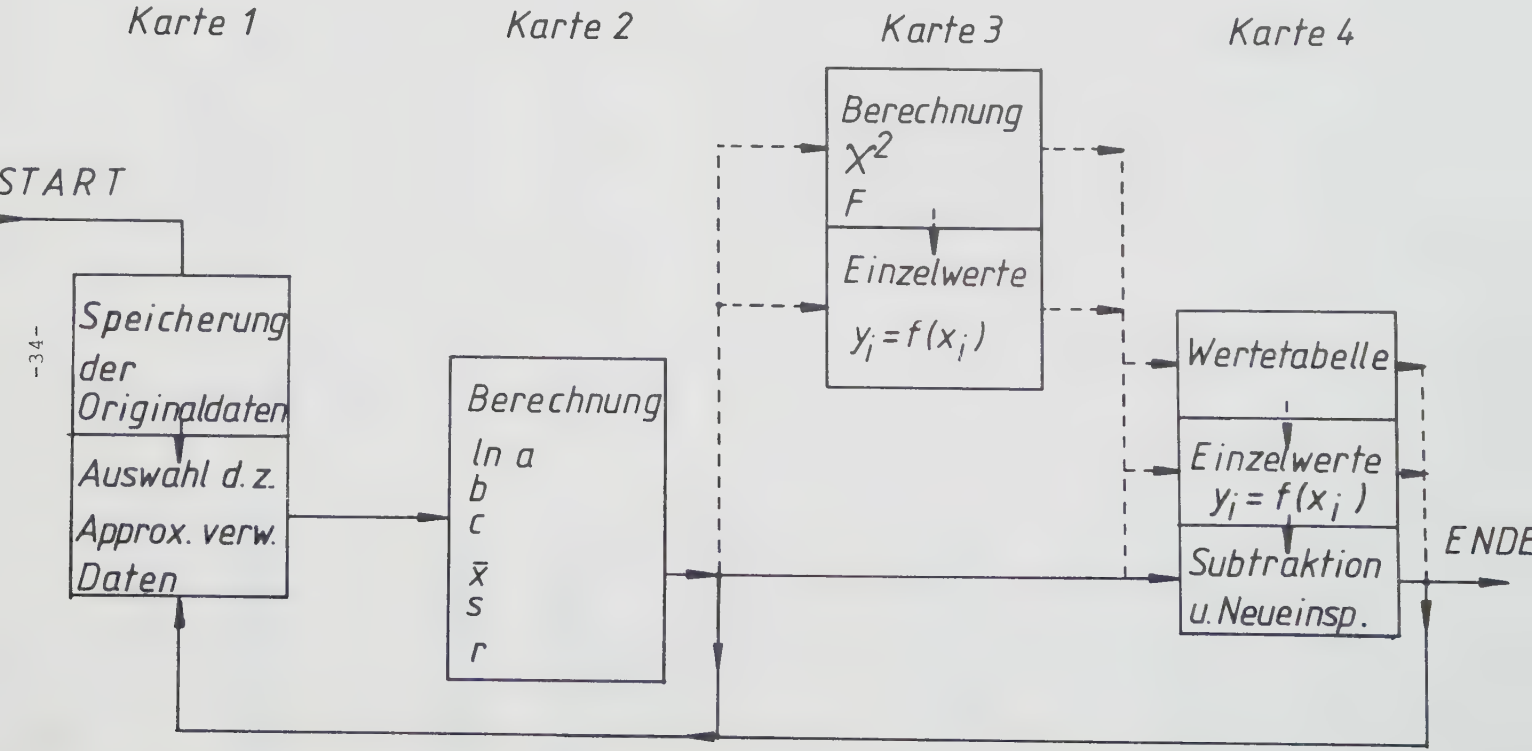
Methode der kleinsten Quadrate:

$$n \cdot \ln a + b \cdot \Sigma x - c \Sigma x^2 = \Sigma \ln y$$
$$\ln a \Sigma x + b \Sigma x^2 - c \Sigma x^3 = \Sigma x \cdot \ln y$$
$$\ln a \Sigma x^2 + b \Sigma x^3 - c \cdot \Sigma x^4 = \Sigma x^2 \cdot \ln y$$

$$c = \frac{\dfrac{\Sigma \ln y}{n} - \dfrac{\Sigma x \ln y}{\Sigma x}}{\dfrac{\Sigma x}{n} - \dfrac{\Sigma x^2}{\Sigma x}} - \frac{\dfrac{\Sigma \ln y}{n} - \dfrac{\Sigma x^2 \ln y}{\Sigma x^2}}{\dfrac{\Sigma x}{n} - \dfrac{\Sigma x^3}{\Sigma x^2}}$$
$$\frac{\dfrac{\Sigma x^2}{n} - \dfrac{\Sigma x^4}{\Sigma x^2}}{\dfrac{\Sigma x}{n} - \dfrac{\Sigma x^3}{\Sigma x^2}} - \frac{\dfrac{\Sigma x^2}{n} - \dfrac{\Sigma x^3}{\Sigma x}}{\dfrac{\Sigma x}{n} - \dfrac{\Sigma x^2}{\Sigma x}}$$

$$b = \frac{\dfrac{\Sigma \ln y}{n} - \dfrac{\Sigma x \ln y}{\Sigma x}}{\dfrac{\Sigma x}{n} - \dfrac{\Sigma x^2}{\Sigma x}} + c \cdot \frac{\dfrac{\Sigma x^2}{n} - \dfrac{\Sigma x^3}{\Sigma x}}{\dfrac{\Sigma x}{n} - \dfrac{\Sigma x^2}{\Sigma x}}$$

$$\ln a = \frac{\Sigma \ln y}{n} + c \cdot \frac{\Sigma x^2}{n} - b \cdot \frac{\Sigma x}{n}$$


Karte 1
Karte 2
Karte 3
Karte 4
START
Speicherung der Originaldaten
Auswahl d. z. Approx. verw. Daten
Berechnung
ln a
b
c
x̄
s
r
Berechnung
χ²
F
Einzelwerte
yi = f(xi)
Wertetabelle
Einzelwerte
yi = f(xi)
Subtraktion u. Neueinsp.
ENDE

Karte 1

- *LBL A* x_{anf} ↑ x_{end} *Gesamtwertetabel*
- *LBL B* y_i *Gesamtwertetabelle*
- *LBL C* x_{anf} ↑ x_{end} *z. Approximation verw. Werte*

Karte 2

- *LBL C* *PRT:* *ln a*
  b
  c
  $\bar{x}$
  s
  r

Karte 3

- LBL D — PRT: χ^2

$$F = \int_{\bar{x}-5s}^{\bar{x}+5s} y\,dx$$

- LBL E — x_i — PRT: x_i

$$y_i = f(x_i)$$

Karte 4

- LBL c — Δx — Wertetabellenabstand Δx (sonst $\Delta x = 0{,}1$)
- LBL d — x_{anf} — Wertetabelle PRT:

$$x_1 \quad y_1 = f(x_1)$$
$$\vdots$$
$$x_n \quad y_n = f(x_n)$$

(x_{end})

- LBL E — x_i — PRT: x_i

$$y_i = f(x_i)$$

- LBL e — Subtraktion und Neueinspeicherung

Karte 5

- LBL A — Einleitung
- LBL B — In a / b / c — (max. 6-mal)
- LBL b — Δx — Abstand : Tabelle od. Graphik (sonst $\Delta x = 0{,}1$)
- LBL c — $y = f(\bar{x})$ — für Graphik (sonst Wertetabelle)
- LBL C — x_{anf} / x_{end} — PRT: Wertetabelle od. Graphik
- LBL E — x_i — PRT : x_i $y_i = f(x_i)$
- LBL D — F_i — Fläche / Fläche% PRT : F_i

R/S — PRT : F_i / %

Karte 1

001	*LBLA	21 11
002	CLRG	16-53
003	P≠S	16-51
004	CLRG	16-53
005	EEX	-23
006	4	04
007	÷	-24
008	STO0	35 00
009	R↓	-31
010	ST+0	35-55 00
011	EEX	-23
012	2	02
013	÷	-24
014	ST+0	35-55 00
015	P≠S	16-51
016	CF0	16 22 00
017	RTN	24
018	*LBLB	21 12
019	F0?	16 23 00
020	GTOP	22 00
021	EEX	-23
022	2	02
023	*LBL1	21 01
024	÷	-24
025	ST+1	35-55 41
026	P≠S	16-51
027	RCL0	36 00
028	INT	16 34
029	1	01
030	ST+0	35-55 00
031	F0?	16 23 00
032	P↑	16-31
033	R↓	-31
034	P≠S	16-51
035	ST+1	35-55 41
036	F0?	16 23 00
037	ISZI	16 26 46
038	F0?	16 23 00
039	GTO3	22 03
040	SF0	16 21 00
041	GTO5	22 05
042	*LBL3	21 03
043	CF0	16 22 00
044	GTO5	22 05
045	*LBLP	21 00
046	EEX	-23
047	6	06
048	GTO1	22 01
049	*LBL5	21 05
050	P≠S	16-51
051	RCL0	36 00
052	INT	16 34
053	P≠S	16-51
054	RTN	24
055	*LBLC	21 13
056	P≠S	16-51
057	RCL0	36 00
058	CLRG	16-53
059	STO0	35 00
060	R↓	-31
061	EEX	-23
062	6	06
063	÷	-24
064	STO1	35 01
065	R↓	-31
066	ST+1	35-55 01
067	EEX	-23
068	3	03
069	÷	-24
070	ST+1	35-55 01
071	RCL1	36 01
072	INT	16 34
073	RCL0	36 00
074	FRC	16 44
075	EEX	-23
076	2	02
077	×	-35
078	INT	16 34
079	-	-45
080	2	02
081	÷	-24
082	STOA	35 11
083	INT	16 34
084	STOI	35 46
085	RCLP	36 11
086	FRC	16 44
087	X=0?	16-43
088	GTO4	22 04
089	*LBL8	21 08
090	GSB6	23 06
091	RCLi	36 45
092	EEX	-23
093	4	04
094	×	-35
095	FRC	16 44
096	EEX	-23
097	2	02
098	×	-35
099	ISZI	16 26 46
100	GSB7	23 07
101	X=Y?	16-33
102	GTOd	22 16 14
103	*LBL4	21 04
104	GSB6	23 06
105	RCLi	36 45
106	FRC	16 44
107	EEX	-23
108	4	04
109	×	-35
110	INT	16 34
111	EEX	-23
112	2	02
113	÷	-24
114	GSB7	23 07
115	X=Y?	16-33
116	GTOd	22 16 14
117	GTO8	22 08
118	*LBLa	21 16 11
119	EEX	-23
120	3	03

121	CHS	-22
122	RTN	24
123	*LBL6	21 06
124	RCL1	36 01
125	INT	16 34
126	ENT↑	-21
127	ENT↑	-21
128	ST+2	35-55 02
129	X²	53
130	ST+3	35-55 03
131	×	-35
132	ST+4	35-55 04
133	×	-35
134	ST+5	35-55 05
135	P≠S	16-51
136	RTN	24
137	*LBL7	21 07
138	P≠S	16-51
139	X=0?	16-43
140	GSB6	23 16 11
141	LN	33
142	ST+6	35-55 06
143	RCL1	36 01
144	INT	16 34
145	STOB	35 12
146	×	-35
147	ST+7	35-55 07
148	RCLB	36 12
149	×	-35
150	ST+8	35-55 08
151	1	01
152	ST+9	35-55 09
153	RCL1	36 01
154	CHS	-41
155	ST+1	35-55 01
156	R↓	-31
157	INT	16 34
158	RCL1	36 01
159	EEX	-23
160	3	03
161	×	-35
162	FRC	16 44
163	EEX	-23
164	3	03
165	×	-35
166	RTN	24
167	*LBL4	21 16 14
168	RCL2	36 02
169	RCL6	36 06
170	×	-35
171	RCL7	36 07
172	RCL9	36 09
173		-35
174	-	-45
175	STOB	35 12
176	RCL7	36 07
177	RCL3	36 03
178	×	-35
179	RCL8	36 08
180	RCL2	36 02
181	×	-35
182	-	-45
183	STO7	35 07
184	RCL2	36 02
185	RCL3	36 03
186	×	-35
187	RCL4	36 04
188	RCL9	36 09
189	×	-35
190	-	-45
191	STO8	35 08
192	RCL3	36 03
193	X²	53
194	RCL2	36 02
195	RCL4	36 04
196	×	-35
197	-	-45
198	STOD	35 14
199	RCL2	36 02
200	X²	53
201	RCL3	36 03
202	RCL9	36 09
203	×	-35
204	-	-45
205	STOA	35 11
206	RCL3	36 03
207	RCL4	36 04
208	×	-35
209	RCL5	36 05
210	RCL2	36 02
211	×	-35
212	-	-45
213	STO4	35 04
214	RCLB	36 12
215	RCLD	36 14
216	×	-35
217	RCL7	36 07
218	RCLA	36 11
219	×	-35
220	-	-45
221	STO5	35 05
222	DSP0	-63 00
223	2	02
224	RTN	24

Karte 2

001	*LBL C	21 13
002	RCL8	36 08
003	RCL D	36 14
004	x	-35
005	RCL A	36 11
006	RCL4	36 04
007	x	-35
008	-	-45
009	1/X	52
010	RCL5	36 05
011	x	-35
012	CHS	-22
013	STO E	35 15
014	RCL8	36 08
015	x	-35
016	RCL A	36 11
017	÷	-24
018	RCL B	36 12
019	RCL A	36 11
020	÷	-24
021	÷	-55
022	STO D	35 14
023	RCL2	36 02
024	x	-35
025	RCL9	36 09
026	÷	-24
027	CHS	-22
028	RCL3	36 03
029	RCL E	36 15
030	x	-35
031	RCL5	36 05
032	÷	-24
033	+	-55
034	RCL6	36 06
035	RCL9	36 09
036	÷	-24
037	+	-55
038	STO C	35 13
039	DSP 9	-63 09
040	PRTX	-14
041	RCL D	36 14
042	PRTX	-14
043	RCL E	36 15
044	PRTX	-14
045	SPC	16-11
046	÷	-24
047	2	02
048	÷	-24
049	STO A	35 11
050	PRTX	-14
051	RCL D	36 14
052	÷	-24
053	ABS	16 31
054	√X	54
055	STO B	35 12
056	PRTX	-14
057	SPC	16-11
058	RCL A	36 11
059	X²	53
060	RCL E	36 15
061	x	-35
062	RCL C	36 13
063	+	-55
064	STO 4	35 04
065	0	00
066	STO 3	35 03
067	STO 5	35 05
068	STO 6	35 06
069	STO 7	35 07
070	STO 8	35 08
071	GSB 0	23 00
072	X=0?	16-43
073	GTO 4	22 04
074	*LBL 5	21 05
075	GSB 6	23 06
076	RCL i	36 45
077	EEX	-23
078	4	04
079	x	-35
080	FRC	16 44
081	EEX	-23
082	2	02
083	x	-35
084	ISZ I	16 26 46
085	GSB 7	23 07
086	X=Y?	16-33
087	GTO d	22 16 14
088	*LBL 4	21 04
089	GSB 6	23 06
090	RCL i	36 45
091	FRC	16 44
092	EEX	-23
093	4	04
094	x	-35
095	INT	16 34
096	EEX	-23
097	2	02
098	÷	-24
099	GSB 7	23 07
100	X=Y?	16-33
101	GTO d	22 16 14
102	GTO 5	22 05
103	*LBL 0	21 00
104	RCL 1	36 01
105	FRC	16 44
106	STO 1	35 01
107	EEX	-23
108	3	03
109	x	-35
110	INT	16 34
111	ST+1	35-55 01
112	RCL 0	36 00
113	FRC	16 44
114	EEX	-23
115	2	02
116	x	-35
117	INT	16 34
118	-	-45
119	2	02
120	÷	-24

```
121   STO2      35 02
122    INT      16 34
123   STOI      35 46
124   RCL2      36 02
125    FRC      16 44
126    RTN         24
127  *LBL6      21 06
128   RCL1      36 01
129    INT      16 34
130   RCLA      36 11
131      -         -45
132   STO2      35 02
133   ST+3   35-55 03
134     X²          53
135   ST+5   35-55 05
136    P≠S      16-51
137    RTN         24
138  *LBL7      21 07
139    P≠S      16-51
140   X=0?      16-43
141   GSB6   23 16 13
142     LN          32
143    CHS         -22
144   RCL4      36 04
145      +         -55
146   RCLE      36 15
147      ÷         -24
148    ABS      16 31
149     √X          54
150   RCL2      36 02
151   X>0?      16-44
152   GTO6   22 16 11
153     R↓         -31
154  *LBL6   21 16 12
155   ST+E   35-55 06
156   ENT↑        -21
157     X≠          53
158   ST+7   35-55 07
159     R↓         -31
160   RCL2      36 02
161      ×         -35
162   ST+8   35-55 08
163      1          01
164   RCL1      36 01
165   X≠Y?        -41
166   ST+1   35-55 01
167     R↓         -31
168    INT      16 34
169   RCL1      36 01
170    EEX        -23
171      3          03
172      ×         -35
173    FRC      16 44
174    EEX        -23
175      2          02
176      ×         -35
177    RTN         24
178  *LBLd   21 16 14
179   RCL8      36 08
180   RCL6      36 06
181   RCL3      36 03
182      ×         -35
183   RCL9      36 09
184      ÷         -24
185      -         -45
186   STO8      35 08
187   RCL5      36 05
188   RCL3      36 03
189     X²          53
190   RCL9      36 09
191      ÷         -24
192      -         -45
193   RCL7      36 07
194   RCL6      36 06
195     X²          53
196   RCL9      36 09
197      ÷         -24
198      -         -45
199      ×         -35
200    1/X          52
201    ABS      16 31
202     √X          54
203   RCL8      36 08
204      ×         -35
205    ABS      16 31
206   PRTX        -14
207    P≠S      16-51
208    SPC      16-11
209   DSP0     -63 00
210      1          01
211      3          03
212      4          04
213    RTN         24
214  *LBLa   21 16 11
215     R↓         -31
216    CHS         -22
217   GTOb   22 16 12
218  *LBLc   21 16 13
219    EEX        -23
220      3          03
221    CHS         -22
222    RTN         24
223    R/S         51
```

Karte 3

001	*LBL0	21 14
002	P≠S	16-51
003	0	00
004	STO8	35 08
005	GSB0	23 00
006	X=0?	16-43
007	GTO1	22 01
008	*LBL2	21 02
009	GSB3	23 03
010	RCL1	36 45
011	EEX	-23
012	4	04
013	×	-35
014	FRC	16 44
015	EEX	-23
016	2	02
017	×	-35
018	ISZI	16 26 46
019	P≠S	16-51
020	RCL2	36 02
021	-	-45
022	X²	53
023	RCL2	36 02
024	÷	-24
025	ST+8	35-55 08
026	GSB4	23 04
027	X=Y?	16-33
028	GTO9	22 09
029	*LBL1	21 01
030	GSB3	23 03
031	RCL1	36 45
032	FRC	16 44
033	EEX	-23
034	4	04
035	×	-35
036	INT	16 34
037	EEX	-23
038	2	02
039	÷	-24
040	P≠S	16-51
041	RCL2	36 02
042	-	-45
043	X²	53
044	RCL2	36 02
045	÷	-24
046	ST+8	35-55 08
047	GSB4	23 04
048	X=Y?	16-33
049	GTO9	22 09
050	GTO2	22 02
051	*LBL4	21 04
052	1	01
053	RCL1	36 01
054	X≠Y	-41
055	ST+1	35-55 01
056	R↓	-31
057	INT	16 34
058	RCL1	36 01
059	EEX	-23
060	3	03
061	×	-35
062	FRC	16 44
063	EEX	-23
064	3	03
065	×	-35
066	RTN	24
067	*LBL3	21 03
068	RCL1	36 01
069	INT	16 34
070	ENT↑	-21
071	ENT↑	-21
072	RCLD	36 14
073	×	-35
074	X≠Y	-41
075	X²	53
076	RCLE	36 15
077	×	-35
078	-	-45
079	RCLC	36 13
080	+	-55
081	e^x	33
082	STO2	35 02
083	P≠S	16-51
084	RTN	24
085	*LBL9	21 09
086	RCL8	36 08
087	DSP3	-63 03
088	PRTX	-14
089	SPC	16-11
090	RCLB	36 12
091	5	05
092	×	-35
093	ENT↑	-21
094	ENT↑	-21
095	RCLA	36 11
096	X≠Y	-41
097	-	-45
098	STO6	35 06
099	R↓	-31
100	RCLA	36 11
101	+	-55
102	STO5	35 05
103	2	02
104	0	00
105	X≠Y	-41
106	RCLE	36 06
107	STO9	35 09
108	-	-45
109	X≠Y	-41
110	STO7	35 07
111	÷	-24
112	STO8	35 08
113	2	02
114	÷	-24
115	ST+9	35-55 09
116	0	00
117	STO6	35 06
118	RCL7	36 07
119	X≠I	16-41
120	*LBL7	21 07

121	X≠I	16-41
122	STO7	35 07
123	RCL9	36 09
124	GSB8	23 08
125	RCL8	36 08
126	ST+9	35-55 09
127	×	-35
128	ST+6	35-55 06
129	RCL7	36 07
130	X≠I	16-41
131	DSZI	16 25 46
132	GTO7	22 07
133	STOI	35 46
134	RCL6	36 06
135	PRTX	-14
136	SPC	16-11
137	P≠S	16-51
138	DSP0	-63 00
139	4	04
140	1	01
141	RTN	24
142	*LBL8	21 08
143	ENT↑	-21
144	ENT↑	-21
145	RCLD	36 14
146	×	-35
147	X≠Y	-41
148	X^2	53
149	RCLE	36 15
150	×	-35
151	-	-45
152	RCLC	36 13
153	+	-55
154	e^x	33
155	RTN	24
156	*LBLE	21 15
157	DSP2	-63 02
158	PRTX	-14
159	ENT↑	-21
160	ENT↑	-21
161	RCLD	36 14
162	×	-35
163	X≠Y	-41
164	X^2	53
165	RCLE	36 15
166	×	-35
167	-	-45
168	RCLC	36 13
169	+	-55
170	e^x	33
171	PRTX	-14
172	SPC	16-11
173	DSP0	-63 00
174	4	04
175	1	01
176	RTN	24
177	*LBL0	21 00
178	RCL1	36 01
179	FRC	16 44
180	STO1	35 01
181	EEX	-23
182	3	03
183	×	-35
184	INT	16 34
185	ST+1	35-55 01
186	RCL0	36 00
187	FRC	16 44
188	EEX	-23
189	2	02
190	×	-35
191	INT	16 34
192	-	-45
193	2	02
194	÷	-24
195	STO2	35 02
196	INT	16 34
197	STOI	35 46
198	RCL2	36 02
199	FRC	16 44
200	RTN	24
201	R/S	51

Karte 4

001	*LBLe	21 16 15
002	DSPE	-63 02
003	0	00
004	STOI	35 46
005	P≠S	16-51
006	RCL0	36 00
007	FRC	16 44
008	EEX	-23
009	2	02
010	×	-35
011	INT	16 34
012	RCL0	36 00
013	FRC	16 44
014	+	-55
015	STO0	35 00
016	P≠S	16-51
017	*LBL1	21 01
018	RCLi	36 45
019	FRC	16 44
020	EEX	-23
021	4	04
022	×	-35
023	INT	16 34
024	EEX	-23
025	3	03
026	÷	-24
027	P≠S	16-51
028	RCL0	36 00
029	INT	16 34
030	PRTX	-14
031	P≠S	16-51
032	GSB8	23 08
033	GSB6	23 06
034	EEX	-23
035	2	02
036	÷	-24
037	P≠S	16-51
038	RCL0	36 00
039	P≠S	16-51
040	INT	16 34
041	+	-55
042	STOA	35 11
043	GSB7	23 07
044	X=Y?	16-33
045	GTO5	22 05
046	*LBL0	21 00
047	RCLi	36 45
048	EEX	-23
049	4	04
050	×	-35
051	FRC	16 44
052	EEX	-23
053	2	02
054	×	-35
055	P≠S	16-51
056	1	01
057	ST+0	35-55 00
058	X≠Y	-41
059	RCL0	36 00
060	INT	16 34
061	PRTX	-14
062	P≠S	16-51
063	GSB8	23 08
064	GSB6	23 06
065	EEX	-23
066	6	06
067	÷	-24
068	STOB	35 12
069	GSB7	23 07
070	X=Y?	16-33
071	GTO9	22 09
072	RCLA	36 11
073	RCLB	36 12
074	+	-55
075	STOi	35 45
076	P≠S	16-51
077	1	01
078	ST+0	35-55 00
079	P≠S	16-51
080	ISZI	16 26 46
081	GTO1	22 01
082	*LBL5	21 05
083	RCLA	36 11
084	STOi	35 45
085	DSP0	-63 00
086	1	01
087	RTN	24
088	*LBL9	21 09
089	RCLA	36 11
090	RCLB	36 12
091	+	-55
092	STOi	35 45
093	DSP0	-63 00
094	1	01
095	RTN	24
096	*LBL8	21 08
097	ENT↑	-31
098	ENT↑	-21
099	RCLD	36 14
100	×	-35
101	X≠Y	-41
102	X^2	53
103	RCLE	36 15
104	×	-35
105	-	-45
106	RCLC	36 13
107	+	-55
108	e^x	33
109	EEX	-23
110	2	02
111	×	-35
112	INT	16 34
113	EEX	-23
114	2	02
115	÷	-24
116	RTN	24
117	*LBL6	21 06
118	-	-45
119	X<0?	16-45
120	0	00

```
121   EEX      -23
122   ' 2       02
123   X        -35
124   INT    16 34
125   EEX      -23
126   2         02
127   ÷        -24
128   PRTX     -14
129   SPC    16-11
130   RTN        24
131  *LBL?    21 07
132   PSE    16-51
133   RCL0   36 00
134   INT    16 34
135   RCL0   36 00
136   EEX      -23
137   2         02
138            -35
139   FRC    16 44
140   EEX      -23
141   2         02
142   ×        -35
143   PSE    16-51
144   RTN        24
145  *LBLa    21 16 14
146   STOH   35 11
147   R↓       -31
148   STOE   35 12
149   SPC    16-11
150  *LBLH    21 11
151   RCLE   36 12
152   DSP2   -63 02
153   PRTX     -14
154   GSBE   23 05
155   PRTX     -14
156   SPC    16-11
157   RCLE   36 12
158   ENT↑     -21
159   ENT↑     -21
160   FIX  16 23 01
161   GTOC   22 14
162   PSE    16-51
163   RCL9   36 09
164   PSE    16-51
165  *LBLC     21 13
166   +        -55
167   STOB   35 12
168   X≷Y      -41
169   RCLH   36 11
170   X=Y?   16-33
171   GTOB   22 12
172   GTOH   22 11
173  *LBLE    21 12
174   DSP0   -63 00
175   1         01
176   SF1  16 21 01
177   RTN        24
178  *LBLD     21 14
179   .        -62
180   1         01
```

```
181   GTOC     22 13
182  *LBLc   21 16 13
183   PSE    16-51
184   STO9     35 09
185   PSE    16-51
186   CF1  16 22 01
187   RTN        24
188  *LBLE     21 15
189   DSP2   -63 02
190   PRTX     -14
191   ENT↑     -21
192   ENT↑     -21
193   RCLD     36 14
194   %        -35
195   X≷Y      -41
196   X²        53
197   RCLE     36 15
198   ×        -35
199   -        -45
200   RCLC     36 13
201   +        -55
202   e^x       33
203   PRTX     -14
204   SPC    16-11
205   DSP0   -63 00
206   1         01
207   RTN        24
208   R/S        51
```

Karte 5

001	*LBLA	21 11
002	CLRG	16-53
003	PZS	16-51
004	CLRG	16-53
005	CF0	16 22 00
006	SF1	16 21 01
007	0	00
008	STOI	35 46
009	RTN	24
010	*LBLB	21 12
011	STOi	35 45
012	ISZI	16 26 46
013	R↓	-31
014	STOi	35 45
015	ISZI	16 26 46
016	R↓	-31
017	STOi	35 45
018	ISZI	16 26 46
019	RCLI	36 46
020	2	02
021	2	02
022	X=Y?	16-33
023	GTO3	22 03
024	RCLI	36 46
025	3	03
026	+	-55
027	3	03
028	÷	-24
029	RTN	24
030	*LBL3	21 03
031	0	00
032	STOI	35 46
033	RTN	24
034	*LBLb	21 16 12
035	STOD	35 14
036	DSP2	-63 02
037	PRTX	-14
038	SPC	16-11
039	SPC	16-11
040	SF0	16 21 00
041	RTN	24
042	*LBLc	21 16 13
043	ENT↑	-21
044	1	01
045	0	00
046	÷	-24
047	STOC	35 13
048	CF1	16 22 01
049	RTN	24
050	*LBLC	21 13
051	EEX	-23
052	5	05
053	÷	-24
054	STOE	35 15
055	R↓	-31
056	RCLE	36 15
057	+	-55
058	STOE	35 15
059	SPC	16-11
060	0	00
061	STOI	35 46
062	STOB	35 12
063	F0?	16 23 00
064	GTO0	22 00
065	GTO2	22 02
066	*LBL0	21 00
067	RCLE	36 15
068	EEX	-23
069	2	02
070	x	-35
071	INT	16 34
072	EEX	-23
073	2	02
074	÷	-24
075	ENT↑	-21
076	ENT↑	-21
077	X²	53
078	RCLi	36 45
079	X=0?	16-43
080	GTO1	22 01
081	x	-35
082	CHS	-22
083	X≷Y	-41
084	ISZI	16 26 46
085	RCLi	36 45
086	x	-35
087	+	-55
088	ISZI	16 26 46
089	RCLi	36 45
090	+	-55
091	e^x	33
092	ISZI	16 26 46
093	RCLB	36 12
094	+	-55
095	STOB	35 12
096	RCLI	36 46
097	2	02
098	2	02
099	X=Y?	16-33
100	GTO1	22 01
101	GTO0	22 00
102	*LBL2	21 02
103	.	-62
104	1	01
105	STOD	35 14
106	DSP2	-63 02
107	PRTX	-14
108	SPC	16-11
109	SPC	16-11
110	GTO0	22 00
111	*LBL1	21 01
112	0	00
113	STOI	35 46
114	DSP2	-63 02
115	RCLE	36 15
116	EEX	-23
117	2	02
118	x	-35
119	INT	16 34
120	EEX	-23

```
121      3          03
122      ÷         -24
123    FIX  16 23 01
124    PRTX        -14
125    RCLB     36 12
126    FIX  16 23 01
127    GTO3     22 03
128    GTO8     22 08
129   *LBL9     21 09
130    PRTX        -14
131    SPC      16-11
132   *LBL7     21 07
133      0          00
134    STOB     35 12
135    RCLE     36 15
136    EEX         -23
137      2          02
138      ×         -35
139    INT      16 34
140    EEX         -23
141      2          02
142      ÷         -24
143    RCLE     36 15
144    EEX         -23
145      2          02
146      ×         -35
147    FRC      16 44
148    EEX         -23
149      2          02
150                -35
151    Y^X      16-32
152    STO6     22 06
153    RCLD     36 14
154    RCLE     36 15
155      +         -55
156    STOE     35 15
157    GTO3     22 03
158   *LBL8     21 08
159    RCLC     36 13
160      ÷         -24
161    INT      16 34
162    CHS         -22
163      9          09
164      -         -55
165    X≠0?     16-45
166      0          00
167    X≠I      16-41
168    ENT↑        -21
169    DSPi     -63 45
170      0          00
171    PRTX        -14
172     R↓         -31
173    X≠I      16-41
174    STO7     22 07
175   *LBLE     21 15
176    SF0  16 21 00
177    ENT↑        -21
178    ENT↑        -21
179    GTOC     22 13
180   *LBL6     21 06
181    CF0  16 22 00
182    SF1  16 21 01
183    RTN         24
184   *LBLD     21 14
185    STOi     35 45
186    ISZI  16 26 46
187    RTN         24
188      0          00
189    STOI     35 46
190   *LBL4     21 04
191    RCLi     36 45
192    RCLE     36 15
193      +         -55
194    STOE     35 15
195    ISZI  16 26 46
196    RCLi     36 45
197    X=0?     16-43
198    GTO5     22 05
199    GTO4     22 04
200   *LBL5     21 05
201      0          00
202    STOI     35 46
203    RCLE     36 15
204     1/X         52
205    EEX         -23
206      2          02
207      ×         -35
208    STOD     35 14
209   *LBLa  21 16 11
210    RCLi     36 45
211    X=0?     16-43
212    RTN         24
213    DSPi    -63 02
214    PRTX        -14
215    RCLD     36 14
216      ×         -35
217    PRTX        -14
218    SPC      16-11
219    ISZI  16 26 46
220    GTOa  22 16 11
221    R/S         51
```

VI LITERATUR

(1) S. J. SINGER, G. L. NICOLSON :
The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes.
Science 175, 720-731, 1972

(2) V. T. MARCHESI, H. FURTHMAYR, M. TOMITA :
The Red Cell Membrane.
Biochem. Biophys. Res. Commun.66, 676-698, 1975

(3) P. v. SENGBUSCH :
Molekular- und Zellbiologie.
Springer, Berlin, 1979

(4) D. DANON, Y. MARIKOWSKY, E. SKUTELSKY :
The Sequestration of Old Red Cells and Extruded Erythroid Nuclei.
In : Red Cell Structure and Metabolism.
Academic Press, New York, 1969

(5) C. W. LLOYD :
Sialic Acid and the Social Behaviour of Cells .
Biolog. Rev. 50, 325-349, (1975)

(6) S. L. BENEDETTI, P. EMMELOT :
Studies on Plasma Membranes.
J. Cell Science, 499-512, 1967

(7) R. L. LARSSON, M.-B. HJELTE, J. C. ERIKSSON, H. R. LAGERGREN, P. OLSSON :
The Stability of Glutardialdehyde-Stabilized-Heparinized Surfaces in Contact with Blood.
Thrombos. Haemost. 37, 262-273, 1977

(8) Ch. C. BRINTON, M. A. LAUFFER :
The Electrophoresis of Viruses, Bacteria, and Cells, and the Microscope Method of Electrophoresis.
Publication No. 55 of the Department of Biophysics, 428-439, 1968,
University of Pittsburg, Pensylvania

(9) S. M. RAPOPORT :
Medizinische Biochemie.
Volk und Gesundheit, Berlin, 1972

(10) G. PIEFKE :
Feldtheorie I + II .
Bibliographisches Institut, Mannheim, 1971

(11) K. HANNIG, H. WIRTH, B. MEYER, K. ZEILLER :
Theoretical and Experimental Investigations of the Influence of Mechanical and Electrokinetic Variables of the Method.
Hoppe-Seyler´s Z. Physiol. Chem. 356, 1209-1223, 1975

(12) P. OLSSON, H. LAGERGREN, R. LARSSON, K. RADEGRAN :
Prevention of Platelet Adhesion and Aggregation by a Glutardialdehyde-Stabilized Heparin Surface.
Thrombos. Haemost. 37, 274-282, 1977

(13) A. KATCHALSKY, D. DANON, A. NEVO :
Interactions of Basic Polyelectrolytes with the Red Blood Cell.
Biochem. Biophys. Acta 33, 120-138, 1959

(14) A. NEVO, de VRIES, A. KATCHALSKY :
Interactions of Basic Polyelectrolytes with the Red Blood Cell.
Biochem. Biophys. Acta 17, 536, 1955

(15) D. J. ROTHWELL, L. L. HAUSE, S. KOETHE, J. V. STRAUMFJORD :
Surface Charge of Erythrocytes in Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria.
Scand. J. Haematol. 16, 241-244, 1976

(16) J. N. MEHRISHI :
Molecular Aspects of the Mammalian Cell Surface.
Department of Radiotherapeutics, University of Cambridge, 1-70, 1972

L e b e n s l a u f

20.1.1949	geboren in Bad Homburg Vater: Dipl.Ing. Helmut Pfeifer Mutter: Erika Pfeifer, geb. Lux
1955 - 1959	Volksschule in Bad Homburg
1959 - 1968	Kaiserin-Friedrich-Gymnasium Bad Homburg, Abitur
1968 - 1974	Studium und Abschluß an der Technischen Hochschule Darmstadt Diplom für Elektrische Nachrichtentechnik
1974 - 1981	Studium und Abschluß an der Johann Wolfgang Goethe Universität Fachrichtung Humanmedizin, Approbation
seit 1.5.1981	Assistenzarzt im Zentrum der Inneren Medizin, Abteilung für Pneumologie
Juni 1979	Heirat mit Ruth Winkel Pfeifer, geb. Winkel
26.1.1980	Geburt des Sohnes Jonas
6.10.1981	Geburt des Sohnes Justus

Hans Pfeifer

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die im Fachbereich Humanmedizin Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel :

"Einfluß von Heparin auf die Änderung der Oberflächenladung von Erythrozyten"

im Zentrum der Inneren Medizin der J. W. Goethe Universität Frankfurt am Main, Abteilung Hämatologie, unter Leitung von Herrn Prof.Dr. H. Martin mit Unterstützung durch Herrn Dr. K. Schopow und Frau Bühler ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 23.12.1982

Hans Pfeifer

ABSTRACT

PFEIFER, Hans

EINFLUSS VON HEPARIN AUF DIE ÄNDERUNG
DER OBERFLÄCHENLADUNG VON ERYTHROZYTEN.

Erythrozytenmembranen enthalten circa 50% Proteine, 40% Lipide und 10% Kohlenhydrate. Den Kontakt mit einer wässrigen Umgebung stellen dabei die Mucopolysaccharide der Proteine her. Diese positiven Ladungsträger lassen sich durch ein stark negativ geladenes Mucopolysaccharid, Heparin, neutralisieren.
Im elektrischen Feld einer trägerfreien Elektrophorese ändert sich die Wanderungsgeschwindigkeit von Erythrozyten nach Heparinzusatz signifikant gegenüber der ohne Heparinzusatz. Die Heparinbindung an die Erythrozytenoberfläche ist sehr fest.
Den ermittelten Histogrammen aus der trägerfreien Elektrophorese wird die Funktion $y = a \cdot e^{bx-cx^2}$ mit einer Sicherheit von 95% ($p < 0{,}05$) angepaßt. Die errechnete Standardabweichung übersteigt bei konstanten Randbedingungen einen festgelegten Wert ($s = 2$) nicht.

KOCZY-DRUCK, Oppenheimer Landstr. 29, 6 Ffm. 70, Tel. 62 21 91